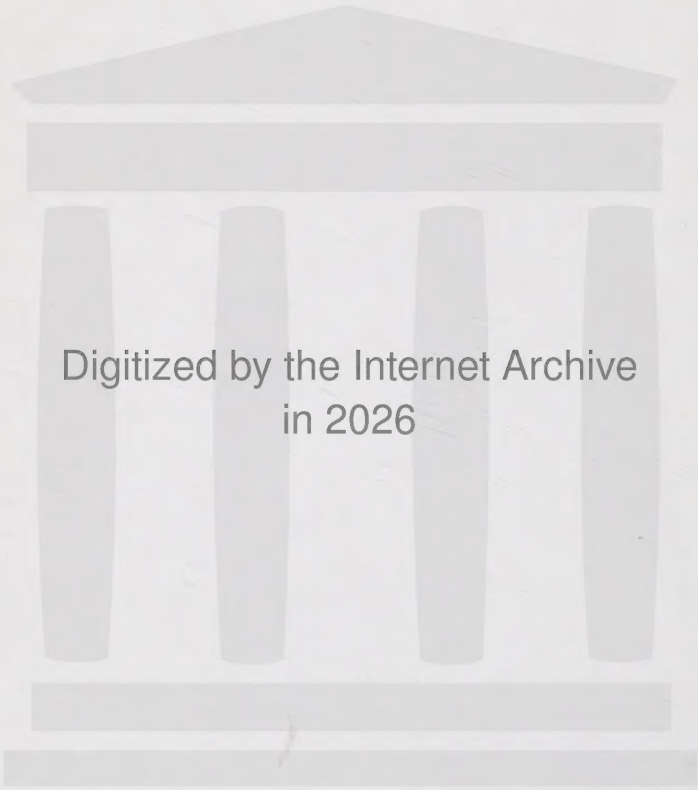
Aus der Kinderklinik C
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. Hans-Joachim Bremer

Säulenchromatographische Untersuchung ausgesuchter basischer methylierter Aminosäuren und Darstellung einer säulenchromatographischen Methode zur Analyse von methylierten Lysinen im Urin

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Lothar Wiesner

1983


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543926_0056

Aus der Kinderklinik C

Direktor: Prof. Dr. Hans-Joachim Bremer

Säulenchromatographische Untersuchung ausgesuchter basischer methylierter Aminosäuren und Darstellung einer säulenchromatographischen Methode zur Analyse von methylierten Lysinen im Urin

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Lothar Wiesner

1983

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Herr Prof. Dr. Brüster

Referent
gez.: Herr Prof. Dr. Bremer

Korreferent
gez.: Herr Prof. Dr. Reinauer

Gliederung

1.	Einleitung und Literaturüberblick
1.1	Bedeutung der Aminosäurenbestimmung für angeborene Stoffwechselstörungen
1.2	Prinzip der quantitativen Aminosäurenanalyse
1.2.1	Überblick der Weiterentwicklungen in der Aminosäurenanalyse
1.2.2	Nachweis methylierter Aminosäuren
1.2.3	Zusammenfassender Überblick der Analyseverfahren für methylierte basische Aminosäuren
1.2.4	Fragestellung
2.	Methoden
2.1	Prinzip der säulenchromatographischen Aminosäurenanalyse
2.2	Reagenzien und apparative Versuchsbedingungen
2.3	Überblick der durchgeführten Experimente
2.4	Prinzip zur Messung spezifischer Verhaltensweisen in der Säulenchromatographie
2.4.1	Retentionszeit als Funktion des pH-Wertes
2.4.2	Retentionszeit als Funktion der Säulentemperatur
2.5	Methoden zur Urinvorpräparation
2.6	Beschreibung zweier Säulenchromatographieverfahren zur Analyse von methylierten Lysinen im Urin
2.6.1	Konstruktion von Säulenbedingungen aus Voruntersuchungen
2.6.2	Säulenbedingungen, modifiziert nach Lange et al. (39,40)
2.7	Wiederfindungsversuche

3. Zusammenstellung der Ergebnisse
4. Ergebnisdiskussion
4.1 Aussagewert von Temperatur- und pH-Wert-Verhalten
4.2 Bedeutung der Urinvorpräparationen
4.3 Vergleich der säulenchromatographischen Analyseverfahren von methylierten Lysinen im Urin
4.4 Wiederfindung
4.5 Ermittlung der Farbkonstanten der methylierten Lysine
5. Zusammenfassung
6. Abbildungen und Tabellen
7. Literaturverzeichnis

1. Einleitung und Literaturübersicht

1.1 Bedeutung der Aminosäurenbestimmung für angeborene Stoffwechselstörungen

Um bei vielen Krankheitsbildern pathologische Zustände charakterisieren zu können, benötigt man Parameter aus dem klinisch-chemischen Bereich.
Gerade bei Aminosäurenstoffwechselstörungen ist das klinische Erscheinungsbild wenig charakteristisch (69), so daß man auf Laborparameter zurückgreifen muß.
Es gibt mehr als 60 angeborene Störungen des Aminosäurenstoffwechsels (65), deren Aufdeckung teilweise erst in den letzten 20 Jahren (36) durch die Verfeinerung der chemischen und technischen Methoden im klinischen Labor gelang.

1.2 Prinzip der quantitativen Aminosäurenanalyse

Die Methode der Wahl zur automatischen quantitativen Analyse von Aminosäuren geht auch heute noch prinzipiell auf eine Methode zurück, die im Jahre 1958 von Spackman et al. (1) veröffentlicht wurde.
In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal eine apparative Anordnung beschrieben, mit deren Hilfe es gelang, ein Aminosäurengemisch quantitativ und vollautomatisch zu bestimmen. Das Prinzip beruht darauf, daß die einzelnen Aminosäuren in zeitlich definierter Reihenfolge säulenchromatographisch eluiert, mit einem Farbreagenz (60,61) versetzt und photometrisch gemessen werden.

1.2.1 Überblick der Weiterentwicklungen in der Aminosäurenanalyse

Daß im Vergleich zu den ersten vollautomatischen Aminosäurenanalysen wesentliche Weiterentwicklungen zu verzeichnen sind, liegt weniger an Veränderungen der Methode als an den einzelnen Teilbedingungen, die durch systematische Forschung zu technischen Verbesserungen und Neuerungen führten.

Sulfonierte Polystyrolharze (2,3,29) wurden erstmalig 1951 zur Trennung von Aminosäuren eingesetzt. Hamilton (4) untersuchte die Partikelgröße verschiedener Harze und deren Effekte bei verändertem Durchfluß.

Systematische Untersuchungen von Quervernetzung und Harzgrößen (12) zeigten dann deren Auswirkungen auf die Elution der Aminosäuren.

Technische Verfeinerungen der Kunstharzherstellung führten dann zum Ersatz von pulverisierten durch sphärische Harze (6), sowie zu ihrem Einsatz bei der Trennung (7-10) von Aminosäuren von Untersuchungsmaterial physiologischer Proben.

Verbesserung der optischen und elektrotechnischen Teilsysteme bewirkten eine Heraufsetzung der Empfindlichkeit der Methoden bei hoher Genauigkeit (5).

Weitere Techniken (Verkleinerung der Säulenquerschnitte (73), Mikroküvetten, Schreiberspreizungen) senkten die reproduzierbare Nachweisgrenze auf 1-2 Nanomol einzelner Aminosäuren (71,72).

Eine weitere Modifikation stellt die Benutzung von Lithium-Puffern (11) dar, wodurch eine Trennung von Asparagin und Glutamin möglich wurde. Die Ninhydrinstabilität wurde durch eine andere Herstellungsweise heraufgesetzt(60,62).

Diese Fortentwicklung der vollautomatischen Aminosäurenanalyse bewirkte im wesentlichen zwei Dinge:

- die Einsetzbarkeit in der Routine durch einfache Handhabung und schnellere Analysenzeiten
- die Entdeckung weiterer ninhydrinpositiver Substanzen (59), was zwangsläufig eine Folge der verfeinerten Analyse war.

Zur Verdeutlichung seien hier King (14) und Hamilton (5, 15) zitiert, welche darlegten, daß mit Hilfe der angewandten Methodenverfeinerungen 90 ninhydrinpositive Substanzen in 1 ml menschlichem Urin analysiert werden konnten im Gegensatz zu 45 ninhydrinpositiven Substanzen in 5 ml Urin mittels alter Methoden (1).
Genauere Analysen demonstrierten Befunde, bei welchen sich verschiedene Substanzen überlappten (23) und die Konzentrationen in physiologischem Material u. a. auch von Aufbereitungsmethoden und Bindungsform der Aminosäuren abhingen (26).

Trotz der Verbesserung der Analytik gibt es heute noch keine Methode, die im Urin in einem Analysenschritt alle wesentlichen Aminosäuren trennt. Es gibt nach wie vor einige Substanzgruppen, die sehr schwer oder unzureichend getrennt werden können.

1.2.2 Nachweis methylierter Aminosäuren

Im folgenden Teil soll ein Abriß über den Erstnachweis methylierter Aminosäuren in physiologischen Proben gegeben werden, die im experimentellen Teil näher untersucht wurden.

So wurde N-ε-Monomethyllysin (MML) 1959 als Proteinbaustein der Geißeln von Salmonella typhimurium von Ambler und Rees (13) entdeckt. Es folgten weitere Nachweise von methylierten Lysinen in unterschiedlichsten physiologischen Materialien (31,44,46,48,51).
Perry et al. (20) wiesen MML in freier Form als normalen Plasmabestandteil nach, Asatoor (21) gelang der Nachweis im Urin.
Paik und Kim (19) zeigten, daß N-ε-Dimethyllysin (DML) in verschiedenen Histidinfraktionen von Thymusgewebe enthalten war, Hempel et al. (18,45) gelang der entsprechende Nachweis für N-ε-Trimethyllysin (TML) als Bestandteil von Histonen in Hühnererythrozyten. Im menschlichen Urin wurde das Vorkommen von DML und TML in freier Form durch die Arbeit von Kakimoto und Akazawa (22) bestätigt. Es ist ebenfalls auf die Arbeit von Kakimoto und Akazawa (22) zurückzuführen, daß zwei dimethylierte Arginine in freier Form im menschlichen Urin isoliert und nachgewiesen wurden.
Bei den beiden Substanzen handelt es sich um N^G,N'^G-Dimethylarginin (sym-DMA) und N^G,N^G-Dimethylarginin (unsym-DMA).
Das Vorkommen von N^G-Monomethylarginin (MMA) demonstrierten Paik und Kim (23,24) in Histonfraktionen. Lange und Hempel (25) verneinten dessen Vorkommen im menschlichen Urin ebenso wie Kakimoto (38). Markiw (63) seinerseits glaubte, MMA im Urin nachgewiesen zu haben.
Schon länger bekannt sind das 1952 im Urin nachgewiesene N^π-Methylhistidin (17) (alte Nomenklatur: 1-Methylhistidin, abgekürzt 1-MH) und das als normaler Urinbestandteil 1954 entdeckte N^τ-Methylhistidin (16) (alte Nomenklatur: 3-Methylhistidin, 3-MH).

1.2.3 Zusammenfassender Überblick der Analyseverfahren für methylierte basische Aminosäuren

Zu ihrer Trennung wurden überwiegend säulenchromatographische Verfahren verwendet. Dabei zeigte sich, daß die üblicherweise zur Trennung von Aminosäuren physiologischer Flüssigkeiten verwendete 2-Säulenmethode nach Spackman et al. (1) sich für diese Analysen nicht eignete, da das MML exakt unter dem Lysin (30,50) lag oder als Schulter des Lysins (20,47) erschien; TML und DML verhielten sich säulenchromatographisch wie Histidin (32). Unter dem Arginin verbarg sich das MMA (23).
So wurden Methoden entwickelt, die störende, nicht interessierende Substanzen mittels enzymatischer Decarboxylierung (28,41) vor Analysebeginn entfernten. Kakimoto und Akazawa (22,41) entwickelten eine spezielle säulenchromatographische Vorfraktionierung, die es gestattet, die Imidazolaminosäuren von den aliphatischen basischen Aminosäuren abzutrennen.
Spezielle Kurzprogramme (9) dienten dazu, nur bestimmte, interessierende Ausschnitte aus einem Gesamtchromatogramm quantitativ zu erfassen. Seely et al. (34) entwickelten beispielsweise eine Kurzmethode zur Bestimmung von methylierten Lysinen (MML, DML, TML) bestimmter Proteinhydrolysate, die allerdings nur durchführbar war, wenn die Proben kein 1-MH oder 3-MH enthielten (40).

Die Analyse methylierter Arginine (MMA, unsym-DMA, sym-DMA) gelang ebenfalls mit einem Kurzprogramm (43), wobei die Untersuchungsmaterialien Proteinhydrolysate und Muskelhydrolysate waren.
Für menschlichen Urin entwickelten Carnegie et al. (42) eine Kurzmethode zur Bestimmung methylierter Arginine, ebenso wie Lange und Hempel (25).
Lange et al. (39,40) publizierten eine Methode, nach der eine Bestimmung der methylierten Lysine und Arginine im Urin möglich sein sollte. Uns gelang es jedoch nicht, mit dieser Methode eine Trennung von interferierenden Substanzen zu erreichen (s. u.).
Ein besonderes Problem stellen allgemein alle Untersuchungen dar, wenn Urin als physiologische Probe (9) zu analysieren ist.
So hat Hamilton (5) im Vergleich von Plasma und Urin gezeigt, daß Urin durch die physiologisch vorkommenden Begleitstoffe (z. B. Salze) Schwierigkeiten bei der Auftrennung bestimmter Aminosäuren machte. Außerdem ist Urin reich an bestimmbaren Einzelkomponenten, so daß Überlappungen und Zusammenfallen der ninhydrinpositiven Substanzen (15) bei der Analyse zu bedenken sind. Im Urin ausgeschiedene Medikamente (35,55) können die Untersuchung stören. Die einzelnen Aminosäuren müssen in zeitlich weit auseinanderliegenden Abständen eluiert werden, da gerade beim Urin große Konzentrationsunterschiede (56) zwischen den Einzelsubstanzen auftreten, so daß Peaks als Schulter größerer Konzentration benachbarter Aminosäuren (20,32) auftreten oder völlig unter einem Extinktions-Peak verschwinden (23,30,50). Andererseits müssen zu kleine Konzentrationen durch Konzentrierung (59) bestimmbar gemacht werden.

Die Variationsbreite der Konzentrationsunterschiede, die physiologischerweise (14) auftreten können, haben allerdings auch den Vorteil, daß pathologische Zustände, die sich als Hyperaminoazidurien (36,65) äußern, im Urin besonders sensibel erfaßt (14) bzw. erst ermöglicht (69) werden.

1.2.4 Fragestellung

Da es bei der Trennung der methylierten Lysine nach der Methode von Lange et al. (39, 40) gewisse, in den Ergebnissen geschilderte Probleme gab, war das Ziel dieser Arbeit festzustellen, wie sich die Trennbedingungen der methylierten Lysine bei verschiedenen pH-Werten des eluierten Puffers und bei verschiedenen Säulentemparaturen verhalten.
Außerdem sollte untersucht werden, ob und welche anderen Aminosäuren die Trennung und Bestimmung dieser Substanzen beeinflussen.

2. Methoden

An dieser Stelle wird ein Abriß über die Methoden zur säulenchromatographischen Bestimmung gegeben, die in den folgenden Versuchen benutzt werden.

2.1 Prinzip der säulenchromatographischen Aminosäurenanalyse

Die vollautomatische Analyse der Aminosäuren erfolgt nach dem von Spackman et al. (1) entwickelten Prinzip, wobei mittels Ionenaustauschchromatographie die einzelnen Aminosäuren ihrer unterschiedlichen elektrischen Ladung entsprechend (36) zu verschiedenen Zeitpunkten durch spezielle Puffer bzw. Pufferabfolgen von der Säule eluiert werden.

2.2 Reagenzien und apparative Versuchsbedingungen

Zu allen quantitativen Aminosäurenbestimmungen wurde der automatische Aminosäurenanalysator BC-200 der Firma Biocal Instrument , München benutzt.

Säulenbedingungen:

Harzhöhe: 59 cm

Säulendurchmesser: 0,9 cm

Harzfüllung: Mischung der Harze Aminex A6 und Aminex A5 im Verhältnis 2 : 1 (Firma Bio-Rad Instruments GmbH, München)

Diese Säulenbedingungen wurden für alle Bestimmungen gleichermaßen benutzt.

Ninhydrin-Reagenz (3 l) nach Moore und Stein (60, 61):

2250	ml Methylcellusolve
750	ml Acetatpuffer
60	g Ninhydrin
1,2	g Zinn(II)-chlorid

Acetatpuffer (20 l) (1, 3):

2945	g Kaliumacetat
1360	g Natriumacetat x 3 H_2O
40	g Kaliumcitrat
1	l Eisessig

destilliertes Wasser auf 20 Liter

Elutionspuffer (20 l) (1, 3):

686,3	g Natriumcitrat x 2 H_2O
40	ml Brij 35-Lsg. (50 g/100 ml)
2	ml Caprylsäure

Je nach gewünschtem pH-Wert wurde konzentrierte Salzsäure (37%ig) hinzugefügt (bei pH 5,28 ca. 130 ml HCl) und mit der entsprechenden Menge destilliertem Wasser zum Endvolumen aufgefüllt, so daß eine Natriumnormalität von 0,35 N resultierte.

Getestete Aminosäuren bzw. deren Salze:

L-3-Methylhistidin

L-1-Methylhistidin

N^G-Monomethyl-L-arginin-di(p-hydroxyazobenzol-p'-sulfonat)-monohydrat

N^G,N^G-Dimethyl-L-arginin-di(p-hydroxyazobenzol-p'-sulfonat)-monohydrat

N^ε-Trimethyl-L-lysin-di(p-hydroxyazobenzol-p'-sulfonat)-monohydrat

N^ε-Monomethyl-L-lysin-hydrochlorid

(Diese Substanzen wurden von der Firma Calbiochem GmbH, Giessen bezogen.)

N^G,N'^G-Dimethyl-L-arginin-di(p-hydroxyazobenzol-p'-sulfonat)-monohydrat
(Firma Sigma Chemie GmbH, München)
N^ε-Dimethyl-L-lysin-hydrochlorid
(Firma R. Paesel KG, Frankfurt).
Alle übrigen Chemikalien wurden von der Firma E. Merck, Darmstadt, bezogen.

Beim Auftrennen der Aminosäuren durch die Säulenchromatographie bedurfte es nicht einer Vorabtrennung der Begleitionen, da die Hydrochlorid-Ionen bzw. die Hydroxyazobenzolsulfonat-Ionen frühzeitig von der Säule eluiert wurden und die Analyse der basischen Aminosäuren in keiner Weise beeinträchtigten.

2.3 Überblick der durchgeführten Experimente

Der experimentelle Teil gliedert sich in zwei Bereiche.
Um überhaupt ein entsprechendes Verfahren für die methylierten aliphatischen basischen Aminosäuren entwickeln zu können, wurden zunächst einmal die säulenchromatographischen Verhaltensweisen der methylierten Aminosäuren (3-MH, 1-MH, MML, DML, TML, MMA, sym-DMA, unsym-DMA) untersucht, um spezielle Charakteristika sowohl einzelner als auch bestimmter Gruppen von Aminosäuren zu erfassen.
Wegweisend für diese Analysenreihe waren Arbeiten von Hamilton (15) und Long und Geiger (12), die jeweils unter sonst konstanten, genau definierten Säulenlaufbedingungen einen Parameter (Temperatur, Normalität des Puffers, pH-Wert, Pufferzusätze, Harzeigenschaften) systematisch änderten und so deren Auswirkungen auf das Chromatogramm beurteilen konnten.

Im zweiten Teil wird mit Hilfe der ermittelten Daten ein Verfahren zur Urinanalyse der methylierten Lysine entwickelt.
Orientierungspunkte für diese Methode waren Arbeiten von Seely et al. (34) und Lange et al. (25,39,40).

2.4 Prinzip zur Messung spezifischer Verhaltensweisen in der Säulenchromatographie

Das säulenchromatographische Verhalten der methylierten basischen Aminosäuren wird dargestellt, indem die beiden wichtigsten Parameter (Temperatur- und pH-Veränderung), die für die Chromatographie-Modifikationen am praktikabelsten sind, in ihren Auswirkungen auf die Retentionszeiten aufgezeigt werden.

2.4.1 Retentionszeit als Funktion des pH-Wertes

In dieser Versuchsreihe betrug die Säulentemperatur 50° C und wurde immer konstant gehalten.
Übrige Säulenbedingungen:
Natriumnormalität: 0,35 N
Pufferdurchfluß: 44,6 ml/h
resultierender Säulendruck: 26 kp/cm
Ninhydrindurchfluß: 30,1 ml/h
Coildruck: 1,2 kp/cm
Gesamtdurchfluß: 74,7 ml/h
Alle übrigen Säulenbedingungen sind aus 2.2 zu entnehmen.
Versuchsdurchführung:
Geändert wurde jeweils der pH-Wert des Elutionspuffers. Alle übrigen Parameter blieben konstant.

Die Retentionszeiten von Tyrosin, Phenyalanin, Histidin, 1-MH, 3-MH, Lysin, MML, DML, TML, Arginin, MMA, sym-DMA, unsym-DMA und Ammoniak wurden einzeln gemessen.

2.4.2 Retentionszeit als Funktion der Säulentemperatur

Bei dieser zweiten Versuchsreihe wurde der pH-Wert des Puffers konstant auf pH 5,28 gehalten, während die Säulentemperatur kontinuierlich geändert wurde.
Wieder wurden die entsprechenden Retentionszeiten der oben genannten ninhydrinpositiven Substanzen gemessen.
Der Durchfluß mußte allerdings erniedrigt werden, da bei tieferen Temperaturen für das System zu hohe Druckwerte entstanden.
Durch die wechselnden Temperaturen änderten sich auch die Druckwerte der Pufferpumpe entsprechend.

Folgende Laufkonditionen wurden festgesetzt:
pH-Wert des Puffers: 5,28
Na-Normalität: 0,35 N
Pufferdurchfluß: 40,5 ml/h
(Der Säulendruck änderte sich mit der jeweiligen Temperatur.)
Ninhydrindurchfluß: 23,2 ml/h
Coildruck: 1 kp/cm
Gesamtdurchfluß: 63,7 ml/h
Alle übrigen Säulenbedingungen sind wieder aus 2.2 zu entnehmen.

2.5 Methoden zur Urinvorpräparation

Die wichtigsten Aufschlußmethoden des Urins sind Hydrolyse (64), Entsalzen (27, 67, 74), Entfernen des Ammoniaks (2, 6, 36, 66).

Durchführung der Entfernung des Ammoniaks (68):
- Alkalisierung der Urinprobe mittels 20%iger Natronlauge auf pH 10.
- offene Lagerung der Probe im Vakuum-Exsikkator über 100%iger Schwefelsäure.
- pH-Wert-Änderung der Probe vor Auftrag mittels 37%iger Salzsäure auf 2,2.

Durchführung der Entsalzung (27, 56):
10 ml Urin läßt man durch eine Säule laufen, die einen Durchmesser von 7 mm hat und mit ca. 5 ml Dowex-50 XA (H^+ - Form, 50 bis 100 mesh) gefüllt ist. Nach Auswaschen mit 100 ml Wasser erhält man die Fraktion der sauren Aminosäuren, eine Elution mit 30 ml 2-molarer Ammoniaklösung eluiert die restlichen Aminosäuren von der Säule. Der Ammoniak der zweiten Fraktion wird wiederum im Vakuum-Exsikkator entfernt.

Saure Hydrolysen der Proben (56, 64):
Den Urinproben wird eine 12-molare Salzsäure im Verhältnis 1 : 1 hinzugegeben; unter Stickstoff werden die einzelnen Proben in Amphiolen abgeschmolzen und für 24 h bei einer Temperatur von 110° C in dem Trockenschrank der Hydrolyse unterzogen.
Feste Bestandteile werden durch Zentrifugation vor Auftrag der Probe abgetrennt.
Anschließend erfolgt die Einengung der Probe mittels Wasserstrahlpumpe. Die getrocknete Substanz wird in pH 2,2-Puffer aufgenommen und ist in dieser Form zur Applikation auf die Säule geeignet.

2.6 Beschreibung zweier Säulenchromatographieverfahren zur Analyse von methylierten Lysinen im Urin

Um die bestmöglichen Säulenbedingungen für die quantitative Analyse der methylierten Lysine aufzuzeigen, sind mehrere Methoden durchgeführt worden (Abb. 7 - 8 a).
Zur Orientierung und Wertung der einzelnen Verfahren dienen dabei folgende Kriterien:

- Vergleich von hydrolysiertem und nativem Urin
- Vergleich der nach Lange et al. (39, 40) angegebenen Methode mit der Methode, die aus eigenen Voruntersuchungen (siehe 2.4) entwickelt wurde

Außerdem erfolgte die Ermittlung der Farbkonstanten für die methylierten Lysine.

2.6.1 Konstruktion von Säulenbedingungen aus Voruntersuchungen

Auf Grund der zuvor erhaltenen Retentionszeiten bei verändertem pH-Wert der Puffer und der Säulentemperatur erfolgte die säulenchromatographische Analyse der methylierten Lysine im Urin unter folgenden Bedingungen:

- Elutionspuffer 0,35 N
  pH-Wert 6,48
- Säulentemperatur: 30° C
- Pufferdurchfluß: 40,5 ml/h
- Ninhydrindurchfluß: 23,2 ml/h
- Gesamtdurchfluß: 63,7 ml/h

Alle übrigen Bedingungen sind aus 2.2 zu entnehmen.
Appliziert wurden native Urinproben (Abb. 7) und hydrolysierte Urinproben (Abb. 7 a).

2.6.2 Säulenbedingungen, modifiziert nach Lange et al. (39, 40)

Die Chromatogramme, die in Abbildung 8 und 8 a festgehalten sind, ergaben sich bei folgenden Säulenbedingungen:

- Elutionspuffer 0,35 N
  pH-Wert 6,92
- Säulentemperatur: 30° C
- Pufferdurchfluß: 40,5 ml/h
- Ninhydrindurchfluß: 23,2 ml/h
- Gesamtdurchfluß: 63,7 ml/h

Auch hier sind alle übrigen Säulenbedingungen aus 2.2 zu entnehmen.
Native Urinproben lieferten Chromatogramme entsprechend Abb. 8, hydrolysierte Urinproben entsprechend Abb. 8 a.

2.7 Wiederfindungsversuche

Einer definierten, konstanten Menge Urin werden unterschiedliche Mengen der einzelnen Aminosäuren zugesetzt, so daß sich zwischen errechneter Konzentration und experimentell gefundener Konzentration eine Korrelation ergeben muß, falls diese Methode zur quantitativen Messung brauchbar ist.
Bei der hier durchgeführten Wiederfindung wurden 0,5 ml Urin und die jeweiligen zugesetzten methylierten Lysine (MML, DML, TML) hydrolysiert.
Die säulenchromatographische Methode, mit der die Wiederfindung durchgeführt wurde, entspricht den Bedingungen unter 2.5.2.1.

3. Zusammenstellung der Ergebnisse

Die Retentionszeit der Aminosäuren als abhängige Variable des pH-Wertes ist tabellarisch in Tabelle 1 und graphisch in Abbildung 2 und 3 festgehalten.

Entsprechende Ergebnisse sind für die Retentionszeiten der Aminosäuren als Funktion der Temperatur in Tabelle 4 und Abbildung 5 und 6 dargestellt.

Zwei Verfahren zur quantitativen Analyse methylierter Lysine im Urin sind in Abbildung 7, 7 a bzw. 8, 8 a dargestellt.

Die Wiederfindungsversuche, die zur Beurteilung der reproduzierbaren Genauigkeit einer Methode herangezogen werden, sind in Tabelle 9 und 10 bzw. 11 und 12 wiedergegeben.

Tabelle 13 zeigt den Vergleich von hydrolysierten und nativen Urinproben.

Die Ergebnisse zur Berechnung der Farbkoeffizienten sind in Tabelle 14 dargestellt.

4. Ergebnisdiskussion

Die Erläuterung der Ergebnisse ist in drei Themenbereiche zusammengefaßt:

1. Einflüsse von Temperatur und pH-Wert auf die getesteten Aminosäuren
2. Urinprobenpräparation für die Ionenaustauschchromatographie

3. säulenchromatographische Analyse von methylierten Lysinen in wäßriger Lösung und Urin, die Wiederfindung und die Farbkonstanten-Ermittlung.

4.1 Aussagewert von Temperatur- und pH-Wert-Verhalten

In den Tabellen und Abbildungen 1 bis 3 sind die Resultate der Retentionszeitverschiebungen in Abhängigkeit vom pH-Wert dargestellt.
Dabei ist zu bemerken, daß bei der pH-Änderung des Elutionspuffers die Histidine die allgemein erwartete, in der Literatur beschriebene pH-Sensibilität (49) aufweisen, was für keine andere der getesteten Aminosäuren so ausgeprägt nachzuweisen ist.
Speziell das 3-MH, welches bei pH 6,50 als erstes der Histidine im Eluat erscheint, ist so pH-sensibel, daß es die beiden anderen Histidine, die selber auch pH-empfindlich reagieren, bei fallendem pH-Wert von 4,00 überholt und als letztes Histidin erscheint.
Alle drei Histidine kreuzen in dem getesteten pH-Bereich das Ammoniak, welches ebenso wie Phenylalanin und Tyrosin als Vergleichsubstanzen mitgelaufen sind.
Ammoniak, und besonders Phenylalanin und Tyrosin zeigen gegenüber den pH-Änderungen geringe Retentionszeitverschiebungen und können als pH-stabil bezeichnet werden.
Arginin und seine Methylderivate zeigen zunächst nur geringe Retentionszeitverschiebungen bei fallenden pH-Werten. Unterhalb von pH 4,75 ist es deutlich ersichtlich, daß eine starke Verlängerung der Laufzeit im Verhältnis zum

pH-Wechsel eintritt, so daß die Arginine in niedrigeren pH-Bereichen (unterhalb von pH 4,75) eine den Histidinen vergleichbare pH-Sensibilität besitzen. Im hohen pH-Bereichen zeigen Arginin und MMA identische Retentionszeiten.

Bedeutsam sind die Tendenzen, die das Lysin und seine Derivate in ihrem Retentionsverhalten gegenüber dem pH-Wechsel zeigen. Während die Reihenfolge der Elution bei pH-Wert 6,50 Lys - MML - DML - TML lautet, dreht sich die zeitliche Abfolge des Erscheinens auf dem Chromatogramm beim pH-Wert 4,00 genau um: TML - DML - MML - Lys.

Dieses säulenchromatographische Verhalten läßt sich gut mit Teilergebnissen anderer Literaturquellen in Einklang bringen. Kakimoto und Akazawa (22) eluierten bei pH 3,24 in der Reihenfolge TML -DML - MML -Lys, während Lange et al. (39,40) und Lange und Hempel (25) bei pH-Werten des Puffers von 6,92 eine Elutions der Aminosäuren in Abfolge Lys - MML - DML - TML erhielten.

Bei hohen pH-Werten des Puffers erscheint von den Lysinen zunächst Lys, gefolgt von MML, DML und TML, während bei niedrigen pH-Werten sich die Reihenfolge umkehrt.

Auf Grund der pH-Veränderungen war eine Trennung bei einem höheren pH-Wert, z. B. pH 6,50, am ehesten zu erwarten.

Entsprechend der pH-Änderungen wurden danach die Säulentemperaturen geändert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen die Tabellen 4 und Abbildungen 5 und 6.

Wesentlich ist, daß die Histidine neben der starken pH-Sensibilität auch mit starken Schwankungen auf Temperaturänderungen reagieren. Auch die Lysine und Arginine zeigen im Vergleich zu Phenylalanin, Tyrosin und Ammoniak stärkere Schwankungen in Abhängigkeit von der Temperaturänderung.
Prinzipiell muß aber festgestellt werden, daß die Retentionszeitänderungen in Abhängigkeit von Temperaturwechseln moderater verlaufen. Eklatante Schwankungen treten im Vergleich zu pH-Variationen nicht auf.
Bei einer Säulentemperatur von 30° C waren die methylierten Lysine ausreichend getrennt, aber Lysin und Histidin nicht ausreichend abgetrennt. Dies war jedoch nach den Ergebnissen der Testung der pH-Abhängigkeit am ehesten bei pH-Werten über 6,50 zu erwarten, so daß sich die Kombination der Säulentemperatur von 30° C mit einem pH-Wert des eluierenden Puffers von ≥ 6,50 für die Trennung anbot.

4.2 Bedeutung der Urinvorpräparationen

Zu den unter 2.5.1 angeführten Vorbereitungen der Proben für die Säulenchromatographie sind Versuche durchgeführt worden.
Es zeigt sich dabei, daß das Entsalzen der Proben keinen unmittelbaren Effekt auf die Güte der Trennungsschärfe hat, was wohl auf die geringen Auftragsmengen (37,52) (ca. 0,5 ml Urin) im Vergleich zur Säulenlänge und Dauer der Analyse zurückzuführen ist.

Als Langzeiteffekt zeigt sich, daß nach ca. 6 - 8 Wochen der Säulendruck in relativ kurzer Zeit stark zunahm, so daß schließlich Undichtigkeiten der Teflonleitungen bei einem kritischen Druck von etwa 30 kp/cm auftraten. Dies führt im Chromatogramm zu "Nachschleppen" und Asymmetrie der photometrisch aufgezeichneten Peaks.
Noch schneller treten diese Phänomene auf, wenn nicht nach jedem Säulenlauf mindestens eine Stunde mit Natronlauge regeneriert wird.
Benson et al. (9) berichten, daß die Ammoniakentfernung nicht notwendig ist, sofern die interessierenden Substanzen vor dem Ammoniak erscheinen. Andere Autoren (69,70) führen ebenfalls keine Ammoniakentfernung bei Urinanalysen durch, teilweise nicht einmal bei basischen Aminosäuren (25).
Bei der Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit ist es zweimal geschehen, daß Ammoniak die Bestimmung des Chromatogramms unmöglich gemacht hat. In beiden Fällen erfolgte die Lagerung des Urins nicht bei - 32° C, sondern bei Zimmertemperatur, wobei durch bakterielle Verunreinigungen des Urins es zu einer massiven Ammoniakbildung gekommen sein muß.
Letztlich wurde auf die Ammoniakentfernung im Urin verzichtet und alle 8 Wochen das Harz gewaschen und die Säule neu gefüllt.
Die Urinproben wurden bei -32° C mit Thymol oder Toluolzusatz (36) gelagert.

Die Hydrolyse von Urinproben verändert sehr stark die Aminosäurenkonzentration des Urins. Es ist schon lange bekannt, daß die Hydrolyse von Urin für eine Konzentrationszunahme sehr viele Aminosäuren gegenüber nativem Urin verantwortlich ist (33, 57, 64).
Zurückzuführen ist dies darauf, daß Peptide oder andersartig gebundene Aminosäuren (53), die im nativen Urin enthalten sind(54), durch die Hydrolyse freigesetzt werden.
Andere Aminosäuren werden durch saure Hydrolyse zerstört (40), z. B. Tryptophan.
Für die chromatographische Analyse der methylierten Lysine ist festzuhalten, daß alle drei getesteten methylierten Lysine hydrolysestabil (20, 56) reagieren.

Da eine Entsalzung (58) und Ammoniakentfernung (25) keine unmittelbaren Einflüsse auf die Bestimmung der methylierten Lysine ausübt, sind diese Verfahren bei unseren Urinanalysen später nicht mehr durchgeführt worden. Eine Hydrolyse des Urins wurde nach 2.5.1 durchgeführt. Die speziellen Gründe werden bei der Besprechung der Ergebnisse der säulenchromatographischen Analyse erläutert.

4.3 Vergleich der säulenchromatographischen Analyseverfahren von methylierten Lysinen im Urin

Nativer Urin wurde nach dem Verfahren untersucht, das sich an den Bedingungen orientiert, die Lange et al (39, 40) bzw. Lange und Hempel (25) beschrieben haben, d. h. mit einem Elutionspuffer mit dem pH-Wert 6,92.
Das entsprechende Chromatogramm zeigt die Abb. 8.
Vergleiche mit Standards ergaben Identität des Peaks nach 234 min mit MML, des Peaks nach 252 min mit DML und nach 267 min mit TML, was aus der Tabelle 7 b zu entnehmen ist.

Im Vergleich dazu zeigt das Chromatogramm in Abb. 7 eine Methode , dessen Elutionsbedingungen wir nach unseren Retentionszeitbestimmungen festlegten (Elutionspuffer pH 6,48 und eine Säulentemperatur von 30° C). Beide Analysen erfolgten mit o,5 ml des gleichen Urins.

Dem Kurvenverlauf ist zu entnehmen, daß zwischen MML und DML in Abb. 7 eine weitere ninhydrin-positive Substanz mit breitbasigem Peak liegt, die bei allen weiteren Säulenläufen beobachtet wurde und im Chromatogramm (Abb.7) mit einem Fragezeichen gekennzeichnet ist. Eine quantitative Analyse der methylierten Lysine ist so nicht möglich.

Die unbekannte Substanz ist in Abb. 8 nicht zwischen dem MML und dem DML erschienen.

Danach wurden wieder Urinproben nach beiden Säulenbedingungen analysiert, wobei diesmal allerdings aliquote Teile eines zuvor hydrolysierten Urins aufgetragen wurden. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abb. 7 a und 8 a festgehalten.
Wie die Abb. 7 a zeigt, ist die Substanz, die zwischen MML und DML gelegen hat, nach der Hydrolyse verschwunden. Die Konzentrationen von MML und DML änderten sich dabei nicht. Nach der Methode von Lange et al. (39,40) getrennt (Abb. 8 a), zeigt sich nach der Hydrolyse der Urinprobe ein scheinbarer Konzentrationsverlust des MML. Da MML aber hydrolysestabil (20,56) ist, ist es wahrscheinlich, daß die Substanz, die bei pH 6,48 zwischen MML und DML eluiert wird, bei der Trennung nach der Methode von Lange et al. mit dem MML-Peak zusammenfällt, solange nativer Urin aufgetragen wird.

Als Resultat läßt sich festhalten, daß die Methode mit einem pH von 6,48 des eluierten Puffers geeigneter als die Methode mit einem Puffer von 6,98 ist, da einmal trotz einer etwas längeren Elutionszeit eine bessere Trennung von MML und DML gelingt, zum anderen die Vollständigkeit einer durchgeführten Hydrolyse bei diesem Verfahren leicht durch das Verschwinden des breitbasigen störenden Peaks überprüfbar ist.

Aus diesem Grunde sind alle weiteren Urinuntersuchungen (Wiederfindung, Hydrolyseauswirkungen) mittels Säulenchromatographie mit dem Puffer pH 6,48 durchgeführt worden. Die entsprechenden Retentionszeiten sind in der Tab. 7 b festgehalten, der Referenzverlauf eines Hydrolysestandards ist in Abb. 7 c wiedergegeben.

Um Auswirkungen der Hydrolyse auf die methylierten Lysine zu testen, wurde ein Vergleich von nativem und hydrolysiertem Urin durchgeführt.
Die Ergebnisse zeigt Tabelle 13.
Auf Grund des geringen Probenumfangs läßt sich aber keine statistisch gesicherte Aussage machen. Die Tendenz der durchgeführten Untersuchung zeigt aber, daß durch die Hydrolyse keine oder zumindest nicht das Ausmaß der Konzentrationszunahme von MML zu verzeichnen ist, wie dies von Asatoor (21) beschrieben wurde.

4.4 Wiederfindung

Die Wiederfindungsversuche sind tabellarisch in den Tab. 9 und 10 und graphisch in Abb. 11 und 12 wiedergegeben.
Die quantitative Brauchbarkeit dieser Methode stellt dabei der Vergleich zwischen rechnerisch ermittelter und experimentell gefundener Konzentration dar, wobei die Regressionsgrade und der Korrelationskoeffizient ein Ausdruck dafür sind.

Die Ergebnisse zeigen, daß diese Methode ausgezeichnet zur quantitativen Analyse der methylierten Lysine geeignet ist.

4.5 Ermittlung der Farbkonstanten der methylierten Lysine

Die Ermittlung der Farbkonstanten für die methylierten Lysine wurde ebenfalls durchgeführt. Diese Ergebnisse sind aus Tab. 14 ersichtlich.
Die Fläche der Peaks wurde nach der Höhe x Breite-Methode (1) ausgerechnet, die Umrechnung erfolgte auf die Einheit 1 Mol. Die Resultate der methylierten Lysine wurden mit Lysin, das als Eichsubstanz mitlief, verglichen.
Die Bestimmung des Farbindex als relativer Größe richtet sich nach Bedingungen, wie sie von Moore und Stein (60) beschrieben worden sind. Leucin erhielt dabei den Wert 1,0 und daraus läßt sich der Wert für Lysin von 1,1 festsetzen.

Seely et al. (34) ermittelten ebenfalls die Farbkonstanten für die methylierten Lysine, wobei sie jedoch andere Elutionsbedingungen benutzt haben.

Tabelle 15 zeigt den Vergleich, wobei die eigenen Werte gut mit denen aus der Arbeit von Seely et al (34) in Einklang zu bringen sind.
Auf die Methodenabhängigkeit der Bestimmung des Ninhydrin-Farbkoeffizienten ist allerdings in vielen Arbeiten (1,8,34,49) hingewiesen worden.

5. Zusammenfassung

In der dargelegten Arbeit wurden die Retentionszeiten in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert bestimmter basischer Aminosäuren gemessen und die unterschiedlichen Kurvenverläufe dargestellt.
Die Probleme, die bei einer Urinpräparation entstehen, wurden ausführlich erläutert und Konsequenzen für die Säulenchromatographie aufgezeigt.
Es wurde ein säulenchromatographisches Verfahren für die Analyse von methylierten Lysinen im hydrolysierten Urin entwickelt.
Die Wiederfindungsversuche mit diesem Analyseverfahren ergaben zufriedenstellende Werte.
Die Farbkonstanten für die methylierten Lysine wurden ermittelt und mit Literaturwerten verglichen.

6. Abbildungen und Tabellen

Tabelle 1 Retentionszeiten als Funktion des pH-Wertes

Säulenbedingungen siehe 2.2 und 2.4.1

pH \ AS	Tyr	Phe	NH_3	His	1-MH	3-MH	Lys	MML	DML	TML	Arg	MMA	unsym-DMA	sym-DMA
6,50	65	75	283	83	131	78	188	205	210	213	431	431	381	392
6,25	66	76	296	110	163	110	191	211	213	213	444	444	388	397
6,00	66	76	296	143	195	145	202	218	220	213	452	452	396	407
5,75	66	76	301	176	226	183	212	227	227	219	463	463	402	414
5,50	68	77	306	227	258	246	220	244	242	224	476	472	404	415
5,25	69	78	307	249	270	260	229	252	255	230	485	477	404	417
5,00	71	81	311	289	311	313	245	262	271	243	513	495	410	429
4,75	75	84	317	309	325	337	279	283	287	254	534	512	418	439
4,50	83	93	331	332	367	397	314	320	309	282	609	584	492	517
4,25	94	104	340	357	396	426	359	359	338	309	675	649	542	581
4,00	101	111	349	381	419	444	386	373	366	348	729	692	599	652

Abbildung 2 Graphische Darstellung
Retentionszeit in Abhängigkeit vom
pH-Wert (2.3.1)

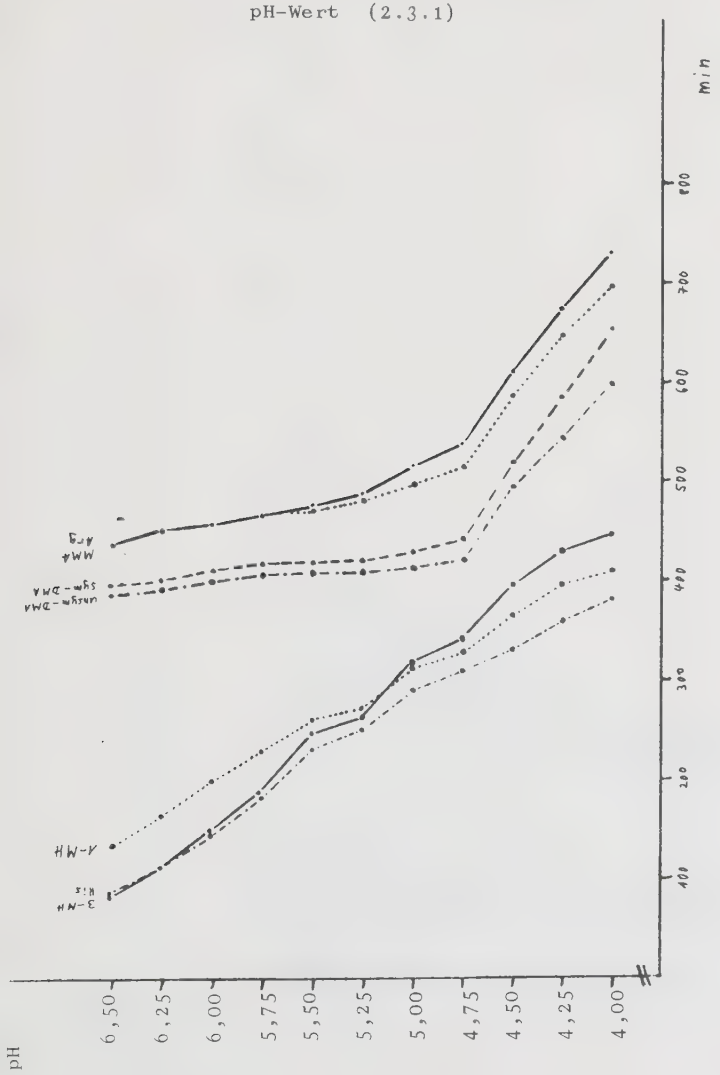


Abbildung 3 Graphische Darstellung
Retentionszeit in Abhängigkeit vom
pH-Wert (2.3.1)

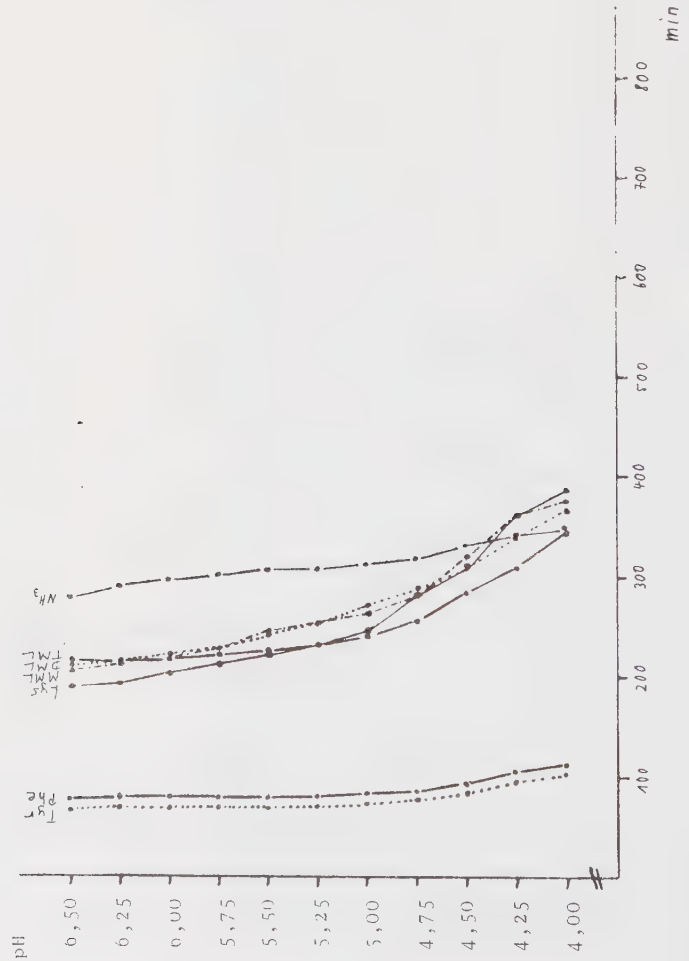


Tabelle 4 Retentionszeit als Funktion der Temperatur

Säulenbedingungen siehe 2.2 und 2.4.2

^{0}C AS	Tyr	Phe	NH_3	His	1-MH	3-MH	Lys	MML	DML	TML	Arg	MMA	unsym-DMA	sym-DMA
30	79	86	311	271	334	330	272	292	309	272	523	485	391	427
40	75	84	304	255	308	297	249	270	277	251	487	477	384	410
50	74	82	298	221	273	261	227	251	254	230	479	467	373	401
65	72	80	289	192	231	243	205	218	206	198	437	436	329	363

Abbildung 5 Graphische Darstellung
Retentionszeit in Abhängigkeit von
der Temperatur (2.3.2)

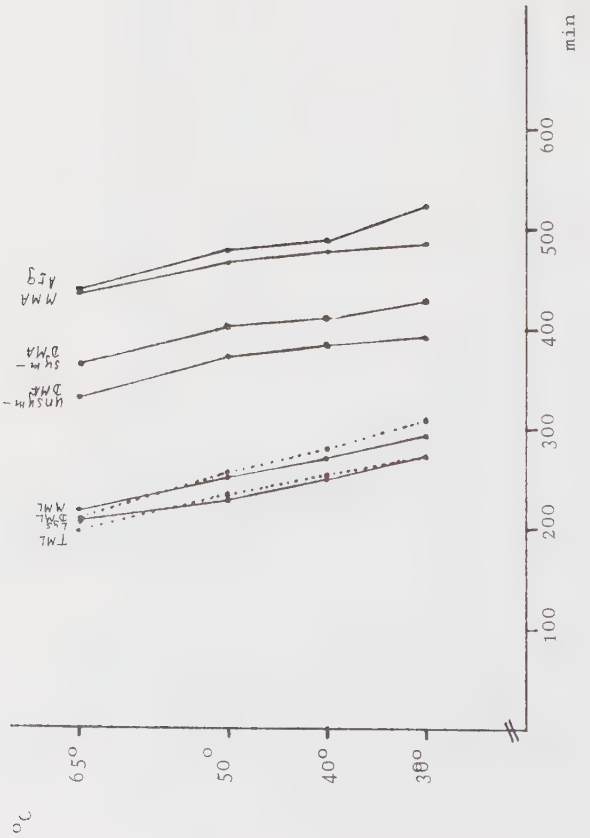


Abbildung 6 Graphische Darstellung
Retentionszeit in Abhängigkeit von der
Temperatur (2.3.2)

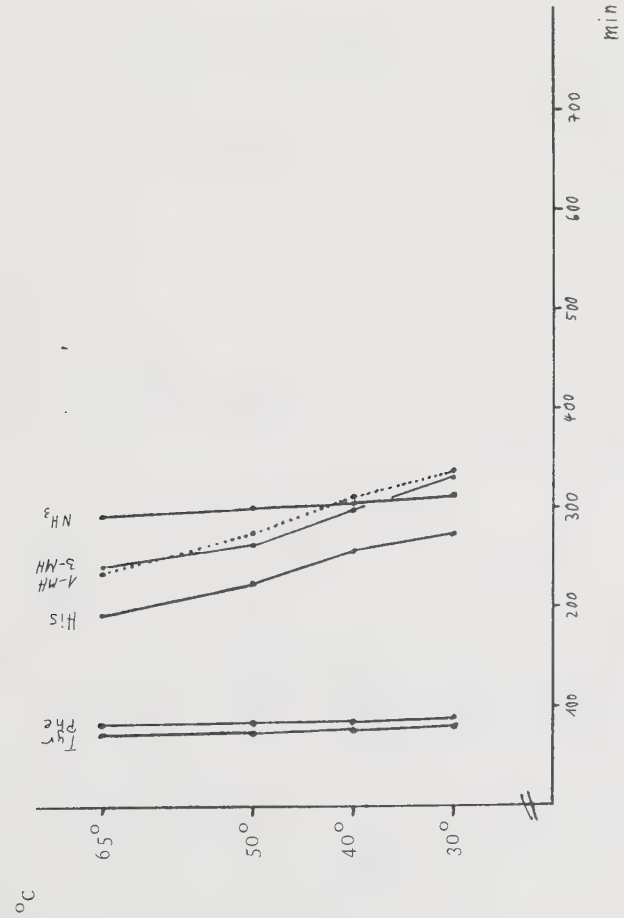


Abbildung 7

Säulenbedingungen: siehe 2.5.2.1

pH: 6,48

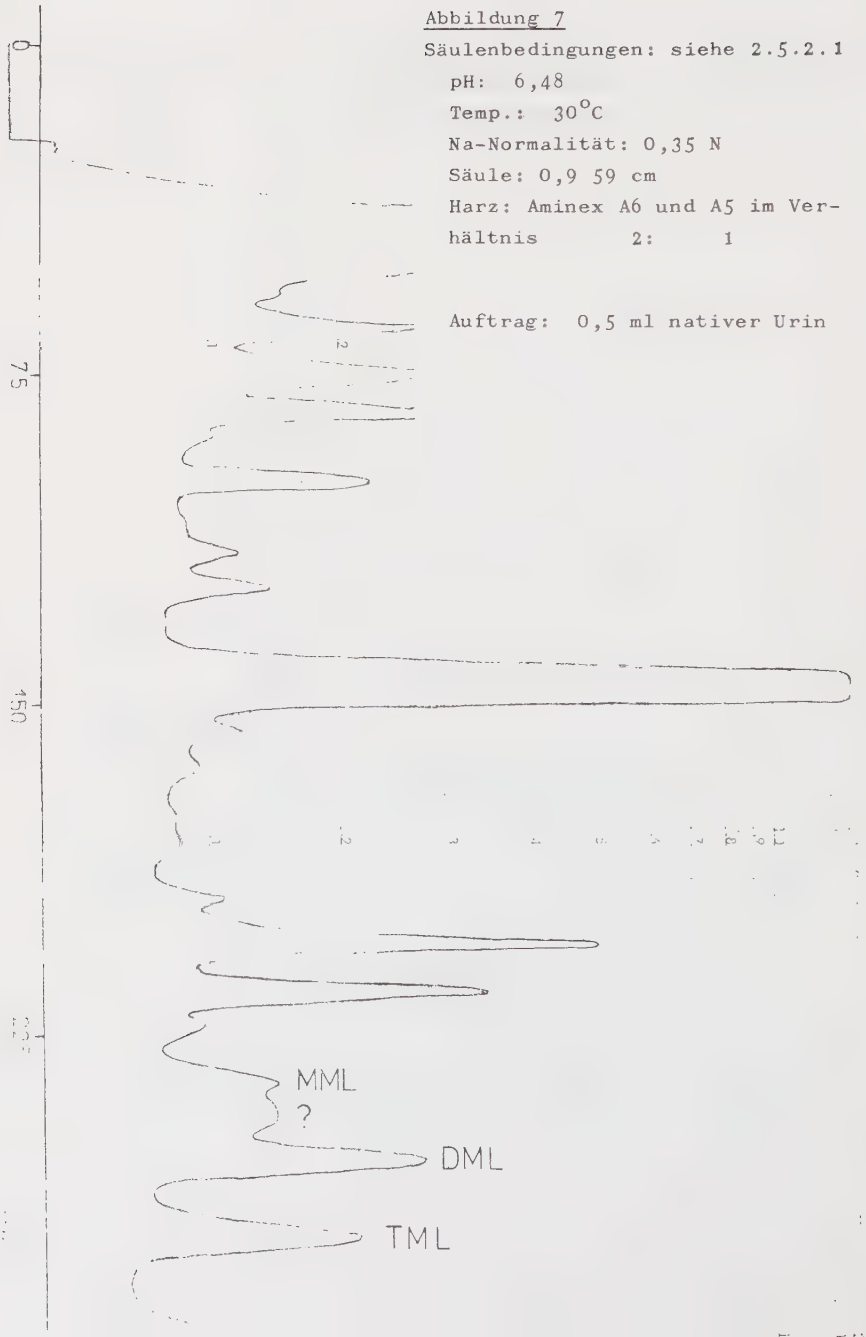
Temp.: 30°C

Na-Normalität: 0,35 N

Säule: 0,9 59 cm

Harz: Aminex A6 und A5 im Verhältnis 2: 1

Auftrag: 0,5 ml nativer Urin



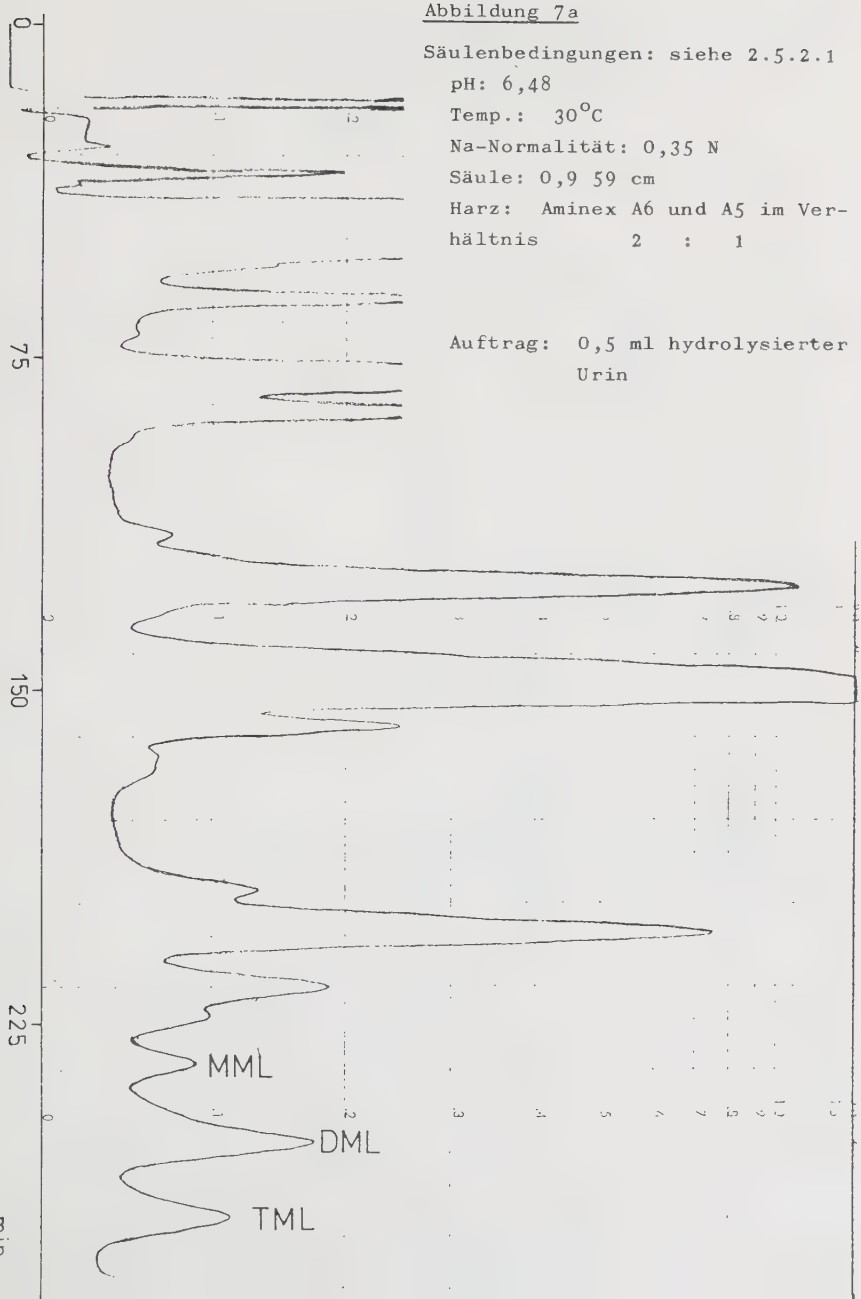


Abbildung 7a

Säulenbedingungen: siehe 2.5.2.1
pH: 6,48
Temp.: 30°C
Na-Normalität: 0,35 N
Säule: 0,9 59 cm
Harz: Aminex A6 und A5 im Verhältnis 2 : 1

Auftrag: 0,5 ml hydrolysierter Urin

Tabelle 7b Tabellarische Auflistung der Retentionszeiten einzelner Substanzen
Säulenbedingungen: siehe 2.5.2.1
pH 6,48
Temperatur 30°C
Normalität 0,35 N

ninhydrinpos. Substanzen	Retentionszeit in min.
MML	234
DML	252
TML	267
Lys	210
Orn	204
NH_3	301
Äthanolamin	298
His	140
Phe	88
1-MH	197,5
3-MH	193,5
D,L-allo-OH-Lys	157 162

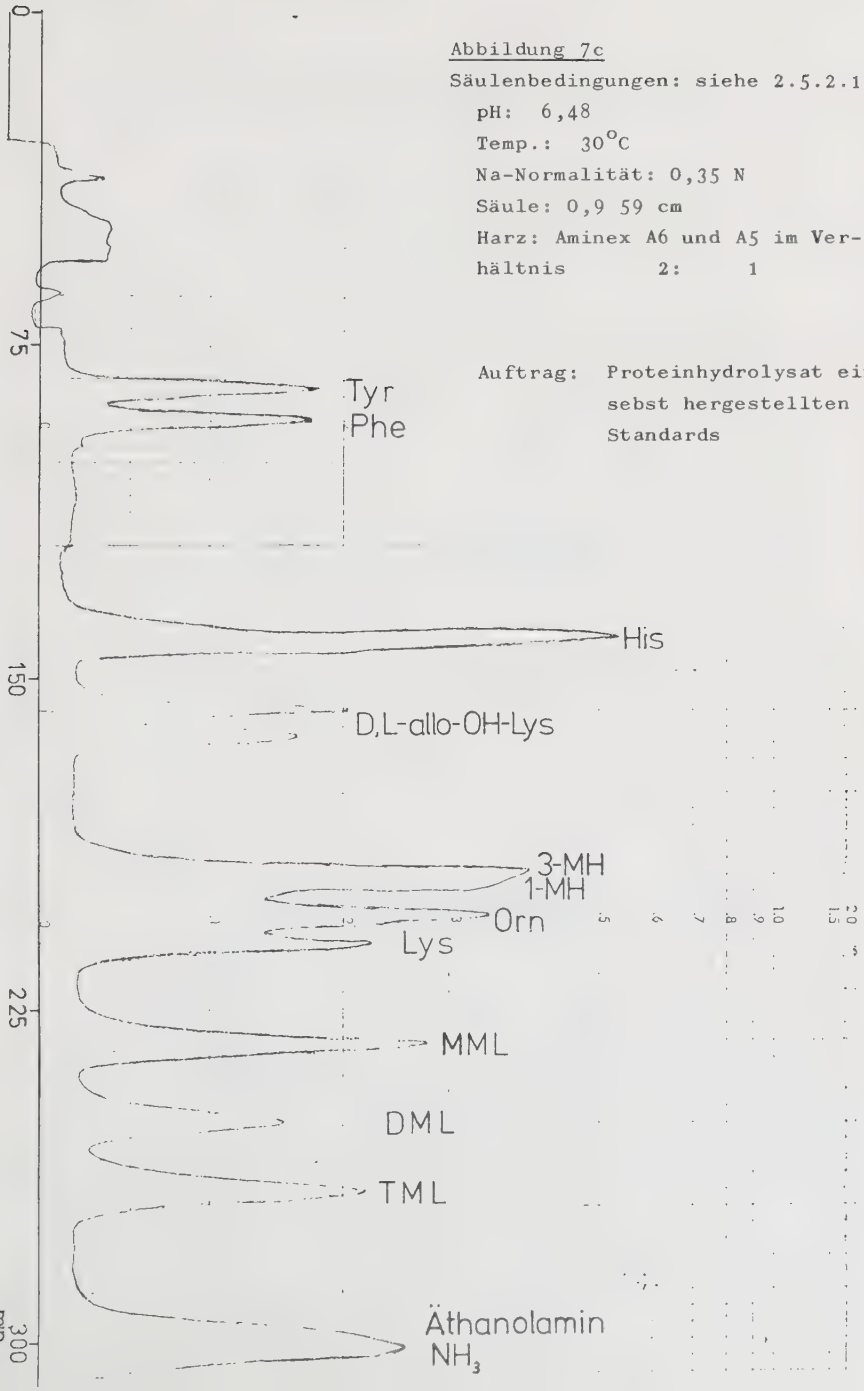


Abbildung 7c

Säulenbedingungen: siehe 2.5.2.1

pH: 6,48

Temp.: 30°C

Na-Normalität: 0,35 N

Säule: 0,9 59 cm

Harz: Aminex A6 und A5 im Verhältnis 2: 1

Auftrag: Proteinhydrolysat eines sebst hergestellten Standards

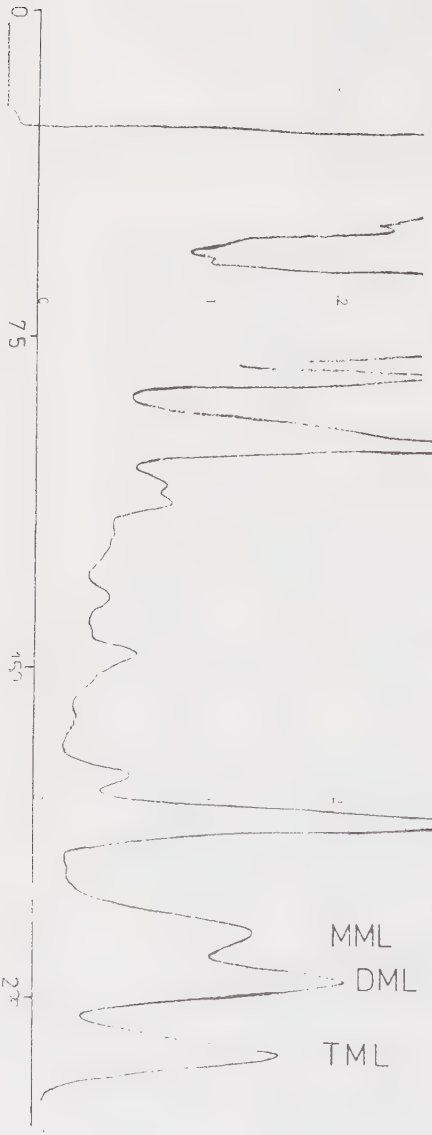


Abbildung 8

Säulenbedingungen: siehe 2.5.2.2

pH: 6,92

Temp.: 30°C

Na-Normalität: 0,35 N

Säule: 0,9 59 cm

Harz: Aminex A6 und A5 im Verhältnis 2 : 1

Auftrag: 0,5 ml nativer Urin

Abbildung 8a

Säulenbedingungen: siehe 2.5.2.2
pH: 6,92
Temp.: 30°C
Na-Normalität: 0,35 N
Säule: 0,9 59 cm
Harz: Aminex A6 und A5 im Verhältnis 2:1

Auftrag: 0,5 ml hydrolysierter Urin

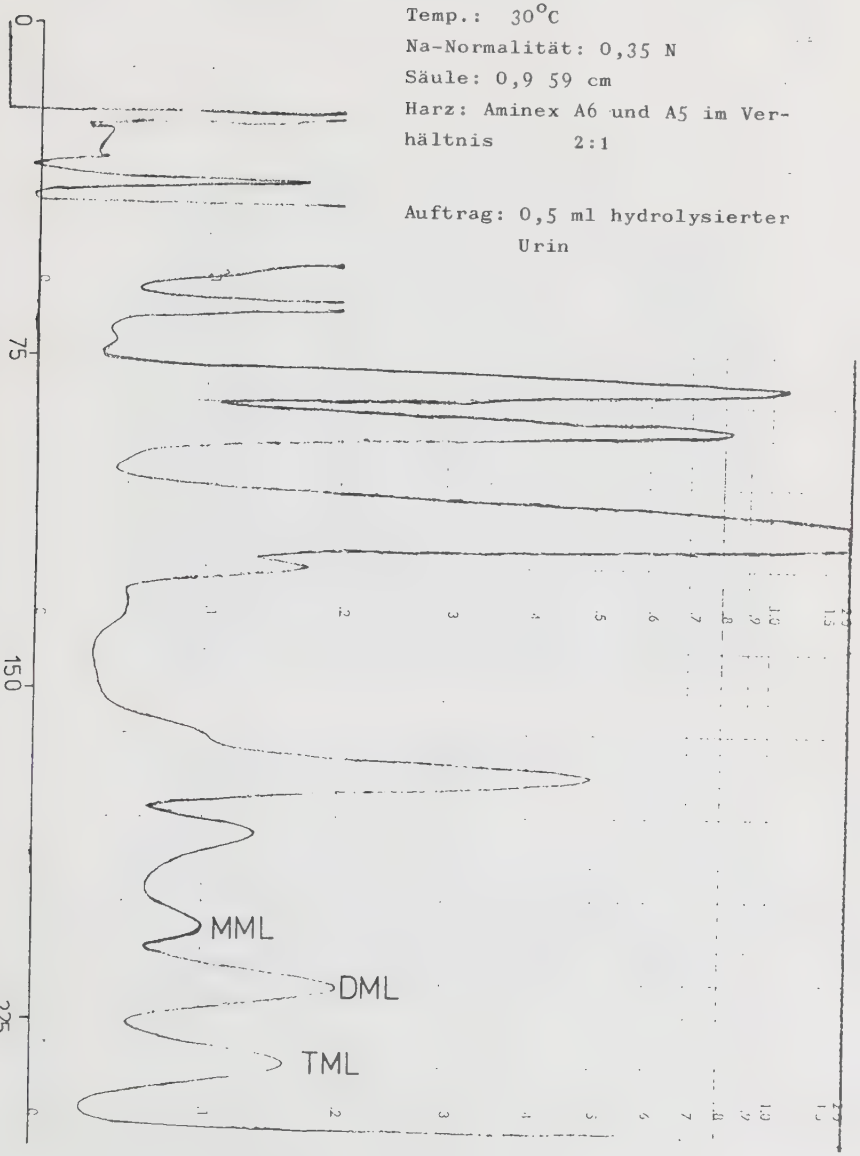


Tabelle 9 Ergebnisse zur 1. Wiederfindung

		0,05 µmol + US	0,04 µmol + US	0,03 µmol +US	0,02 µmol +US	0,01 µmol + US
MML	experiment. Werte	23,75	19,11	15,12	11,83	8,31
	mathemat. Werte	23,23	19,52	15,79	12,08	8,36
	Differenz in %	100,2	98,3	95,8	97,9	99,4
DML	experiment. Werte	30,45	26,91	22,82	20,88	17,40
	mathemat. Werte	30,34	27,13	23,93	20,72	17,52
	Differenz in %	100,4	99,2	95,4	100,8	99,3
TML	experiment. Werte	22,54	20,00	16,28	12,84	9,94
	mathemat. Werte	22,56	19,42	16,28	13,14	10,00
	Differenz in %	99,9	103,0	100,0	97,7	99,4

Standardwerte der methylierten Lysine für 0,05 µmol

MML	DML	TML
18,59	16,03	15,70

Der Urinstandard (US) entspricht o,4ml des gleichen Urins, der hydrolysiert worden ist.

Die Werte für die methylierten Lysine:

MML	DML	TML
4,64	14,31	6,86

Tabelle 10 Ergebnisse zur 2. Wiederfindung

		0,05 µmol + US	0,04 µmol + US	0,03 µmol + US	0,02 µmol + US	0,01 µmol + US
MML	experiment. Werte	23,27	19,65	15,62	12,32	8,30
	mathemat. Werte	23,82	19,93	16,05	12,16	8,27
	Differenz in %	97,9	98,6	97,6	101,3	100,4
DML	experiment. Werte	27,50	22,79	19,44	18,76	13,11
	mathemat. Werte	26,16	22,97	19,77	16,58	13,39
	Differenz in %	105,1	99,2	98,3	113,1	97,9
TML	experiment. Werte	19,87	17,42	13,97	11,21	8,51
	mathemat. Werte	20,94	17,81	14,69	11,56	8,44
	Differenz in %	94,9	97,8	95,1	97,o	100,8

Standardwerte der methylierten Lysine für 0,05 µmol

MML	DML	TML
19,44	15,97	15,63

Der Urinstandard (US) entspricht 0,4 ml des jeweils gleichen Urins, der hydrolysiert worden ist.
Die Werte für die methylierten Lysine:

MML	DML	TML
4,38	10,19	5,31

Abbildung 11 Graphische Darstellung zu Tab. 9

Regressionsgeraden und Korrelationskoeffizienten:

$f_{(MML)} = 381{,}6x + 4{,}18$ r= +0,99

$f_{(DML)} = 321{,}3x + 14{,}05$ r= +0,99

$f_{(TML)} = 323{,}6x + 6{,}61$ r= +0,99

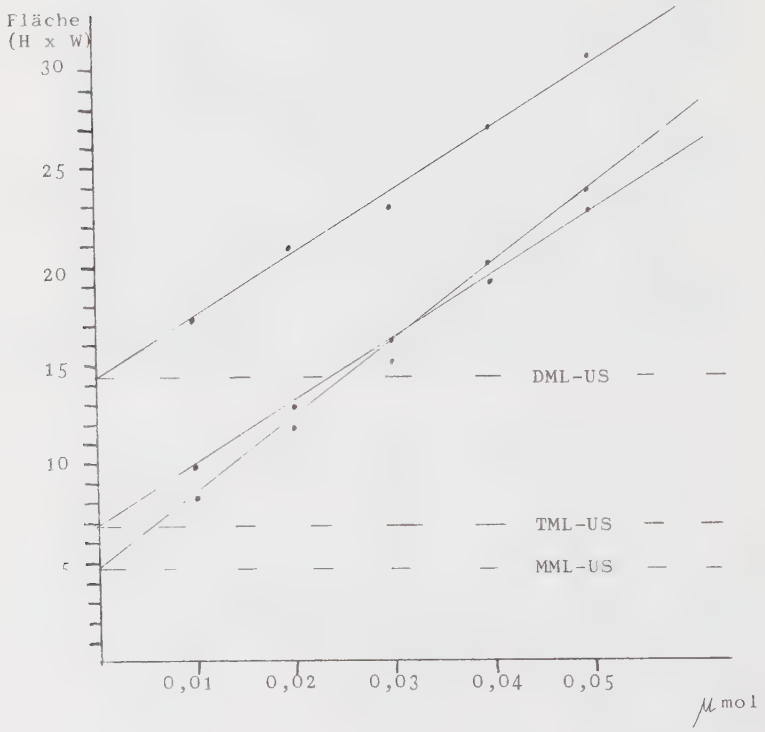


Abbildung 12 Graphische Darstellung zu Tab.10

Regressionsgeraden und Korrelationkoeffizienten:

$f_{(MML)} = 372,7x + 4,65$ r= +0,99

$f_{(DML)} = 328,0x + 10,48$ r= +0,97

$f_{(TML)} = 289,3x + 6,21$ r= +0,99

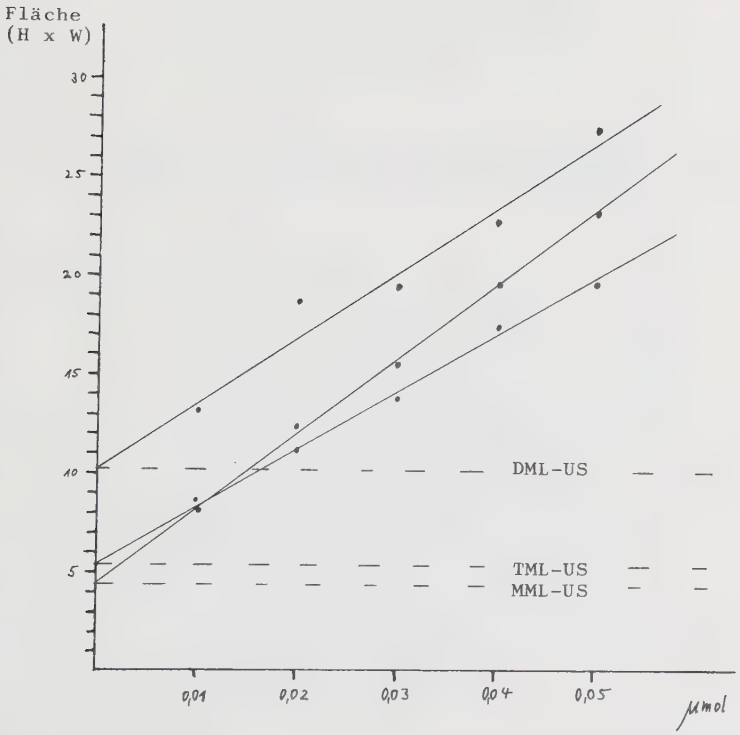


Tabelle 13. Vergleich der methylierten Lysine im nativen und hydrolysierten Urin

13a Nativer Urin (Auftragsmenge 0,4 ml Urin)

Probe	MML	DML	TML
1	6,93	18,80	11,05
2	6,47	19,40	10,35
3	6,96	21,46	10,29
$\bar{x}$	6,79	19,89	10,55

13b Hydrolysierter Urin (Auftragsmenge entspricht den 0,4 ml Urin unter 13a)

Probe	MML	DML	TML
1	7,13	19,09	11,10
2	7,13	19,58	11,76
3	7,14	18,41	11,43
$\bar{x}$	7,13	19,03	11,43

Tabelle 14 Berechnung des Farbkoeffizienten

	Lys	MML	DML	TML
1	21,39	20,84	17,86	17,05
2	21,71	21,59	17,64	16,97
3	21,22	20,63	16,62	16,54
4	22,08	21,16	16,44	16,49
5	22,13	21,02	17,66	17,82
6	21,87	21,81	18,14	17,89
7	22,58	22,14	16,29	16,68
8	21,85	21,31	17,24	17,06
9	$43,7 \times 10^7$	$42,62 \times 10^7$	$34,48 \times 10^7$	$34,12 \times 10^7$
10	1,10	1,07	0,87	0,86

1-7 Versuchsreihen

8 Mittelwert

9 Umrechnung auf die molare Einheit

10 Farbkonstante der methylierten Lysine bei einer Konstanten für Lysin von 1,10

Säulenbedingungen siehe 2.5.2.1

Auftrag: 0,05 mol der vier Aminosäuren

Lysin dient als bekannter Standard (60)

Literaturangaben: (1, 33, 34, 49)

Tabelle 15 Literaturvergleich der Farbkonstanten

	Lys	MML	DML	TML
I[34]	22,06	20,15	19,48	18,48
II[34]	43,5	39,7	39,2	35,5
III	21,85	21,31	17,24	17,06

In ihrer Arbeit haben Seely et al. (34) die Farbkonstanten für die Lysine unter unterschiedlichen Säulenbedingungen ermittelt (siehe Spalte I und II).
Die eigenen Werte stehen in der III. Spalte.

7. Literaturverzeichnis

1 Spackman D.H., Stein W.H., Moore S:
Automatic Recording Apparatus for Use in the Chromatography of Amino Acids
Anal. Chem. 30, 1190 -1206, (1958)

2 Moore S, Stein W.H.:
Chromatography of Amino Acids on Sulfonated Polystyrene Resins
J. Biol. Chem. 192, 663-681, (1951)

3 Moore S, Spackman D.H., Stein W.H.:
Chromatography of Amino Acids on Suflonates Polystyrene Resins - An Improved System
Anal. Chem. 30, 1185 - 1190, (1958)

4 Hamilton P.B.:
Ion Exchange Chromatography of Amino Acids
Anal. Chem. 30, 914 - 919, (1958)

5 Hamilton P.B.:
Ion Exchange Chromatography of Amino Acids - Microdetermination of Free Amino Acids in Serum
Ann. N.Y. Acad. Sci. 102, 55 -75, (1962)

6 Benson J.V., Patterson J.A.:
Accelerated Chromatographic Analysis of Amino Acids Commonly Found in Physiological Fluids on a Spherical Resin of Specific Design
Anal. Biochem. 13, 265 - 280, (1965)

7 Benson J.V., Patterson J.A.:
Accelerated Automatic Chromatography Analysis of Amino Acids on a Spherical Resin
Anal. Chem. 37, 1108 -1110, (1965)

8 Benson J.V., Jones R.T., Cormick J., Patterson J.A.:
Accelerated Automatic Chromatography Analysis of Peptides on a Spherical Resin
Anal. Biochem. 16, 91 - 106, (1966)

9 Benson J.V., Cormick J., Patterson J.A.:
Accelerated Chromatography of Amino Acids Associated with Phenylketonuria, Leucinosis (Maple Syrup Urine Disease), and Other Inborn Errors of Metabolism
Anal. Biochem. 18, 481 -492, (1967)

10 Benson J.V., Gordon M.J., Patterson J.A.:
Accelerated Chromatography Analysis of Amino Acids in Physiological Fluids Containing Glutamine and Asparagine
Anal. Biochem. 18, 228 -240, (1967)

11 Perry T.L., Stedman D., Hansen S.:
A Versatile Lithium Buffer Elution System for Single Column Automatic Amino Acid Chromatography
J. Chromatog. 38, 460 - 466, (1968)

12 Long C.L., Geiger J.W.:
Automatic Analysis of Amino Acids: Effect of Resin Cross-linking and Operational Variables on Resolution
Anal. Biochem. 29,265 - 283, (1969)

13 Ambler, R.P., Rees M.W.:
ε-N-Methyl-lysine in Bacterial Flagellar Protein
Nature, 184, 56, (1959)

14 King J.S.Jr.:
Observations on the Ninhydrin-Positive Substances in Human Urine
Clin. Chim. Acta 9, 441 - 447, (1964)

15 Hamilton P.B.:
Ion Exchange Chromatography of Amino Acids
Anal. Chem. 35, 2055 - 2064, (1963)

16 Tallan H.H., Stein W.H., Moore S.:
3-Methylhistidine, a new Amino Acid from Human Urine
J. Biol. Chem. 206, 825 - 834, (1954)

17 Westall R.G.:
The Amino-Acids and other Ampholytes of Urine
Biochem. J. 52, 638 - 642, (1952)

18 Hempel K., Lange H.W., Birkofer L.:
ε-N-Trimethyllysin, eine neue Aminosäure in Histonen
Naturwiss. 55,37, (1968)

19 Paik W.K., Kim S.:
ε-N-Dimethyllysine in Histones
Biochem. Biophys. Res. Comm. 27, 479 - 483, (1967)

20 Perry T.L., Diamond S., Hansen S.:
ε-N-Methyl Lysine: an Additional Amino-acid in Human Plasma
Nature 222, 668, (1969)

21 Asatoor A.M.:
The Occurrence of ε-N-Methyllysine in Human Urine
Clin. Chim. Acta 26, 147 - 154, (1969)

22 Kakimoto Y., Akazawa S.:
Isolation and Identification of N^G,N^G-and N^G,N'^G-Dimethylarginine, N^ε-Mono-Di, and Glucosylgalactosyl- and Galactosyl-δ-hydroxy-lysine from Human Urine

23 Paik W.K., Kim S.:
ω-N-Methylarginine in Histones
Biochem. Biophys. Res. Comm. 40, 224 - 229, (1970)

24 Paik W.K., Kim S.:
Enzymatic Methylation of Protein Furction from Calf Thymus Nuclei
Biochem. Biophys. Res. Comm. 29, 14 - 20, (1967)

25 Lange H.W., Hempel K.:
Säulenchromatographische Trennung von N^G, N^G-Dimethylarginin, N^G, N'^G-Dimethylarginin, N^G-Monomethylarginin, N^ε-Monomethyllysin, N^ε-Dimethyllysin und N^ε-Trimethyllysin
J. Chromatog. 107, 389 - 392, (1975)

26 McMenany R.H., Lund C.C., Oncley J.L.:
Unbound Amino Acid Concentrations in Human Blood Plasma
J. Clin. Inrest. 36, 1672 - 1679, (1957)

27 Wadman S.K., Fabery H., de Jonge, deBree P.K.:
Rapid, High-Resolution, Two-Dimensional Amino Acid Chromatography on Micro Scale Chromatograms
Clin. Chim. Acta 25, 87 - 90, (1969)

28 Seely J.H., Benoiton L.:
The action of some enzymes on homolysine derivatives
Canad. J. Biochem. 46, 387 - 389, (1968)

29 Moore S., Stein W.H.:
Procedures for the Chromatographic Determination of Amino Acids on Four Per Cent Cross-linked Sulfonated Polystyrene Resins
J. Biol. Chem. 211, 893 - 906, (1954)

30 Tabor H., White Tabor C., Irreverre F.:
Quantitative Determination of Aliphatic Diamines and Polyamines by an Automated Liquid Chromatography Procedure
Anal. Biochem. 55, 457 - 467, (1973)

31 Kühl W.M., Adelstein R.S.:
Identification of -N-Monomethyllysine and ε-N-Trimethyllysine in Rabbit Skeletal Myosin
Biochem. Biophys. Res. Comm. 37, 59 - 65, (1969)

32 Delange R.J., Glazer M., Smith E.L.:
Presence and Location of an Unusual Amino Acid, ε-N-Trimethyllysine, in Cytochrome c of Wheat Germ and Neurospora
J. Biol. Chem. 244, 1385 - 1388, (1969)

33 Stein W.H.:
A Chromatographic Investigation of the Amino Acid Constituents of Normal Urine
J. Biol. Chem. 201, 45 - 58, (1953)

34 Seely J.H., Edattel R., Benoiton N.L.:
A quick seperation of the ε-N-methyl-lysines using the amino acid analyser
J. Chromatog. 44, 618 - 620, (1969)

35 Perry T.L., Dixon G.H., Hansen S.:
Iatrogenic Urinary Amino-Acid Derived From Penicillin
Nature 206, 895 - 897, (1965)

36 Niederwieser A., Curtius H.-Ch.:
Aminosäuren-Analyse in der klinischen Chemie
Z.Klin.Chem. 7, 404 - 426, (1969)

37 Peters J.H., Berridge B.J.:
The Determination of Amino Acids in Plasma and Urine by Ion-Exchange Chromatography
Chromatog. Rev. 12, 157 - 165, (1970)

38 Kakimoto Y.:
Methylation of Arginine and Lysine Residues of Celebral Proteins
Biochem. Biophy. Acta 243, 31 - 37, (1971)

39 Lange H.W., Löwer, R., Hempel K.:
Quantitative Determination of N^{ε}-methylated Lysines in Human Plasma and Urine
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 117 - 120, (1973a)

40 Lange H.W., Löwer R., Hempel K.:
Verbesserte säulenchromatographische Bestimmung N^{ε}-methylierter Lysine in physiologischen Flüssigkeiten
J. Chromatog. 76, 252 - 254, (1973b)

41 Kakimoto Y., Matsuoko Y., Miyaka M., Konishi H.:
Methylated Amino Acid Residues of Proteins of Brain and other Organs
J. Neurochem. 24, 893 - 902, (1975)

42 Carnegie P.R., Fellows F.C.I., Symington G.R.:
Urinary Excretion of Methlyrginine in Human Disease
Metabolism 26, 531 - 537, (1977)

43 Zarkadas C.G.:
A rapid chromatographic method for the determination of ω-N-methylarginines in protein and muscle tissues
Canad. J. Biochem. 56, 952 - 957, (1978)

44 Starbuck W.C., Mauritzen C.M., Taylor C.W., Sovoja Y.S., Busch H.:
A Large Scale Procedure for Isolation of the Glycin-rich, Arginine-rich Histone and the Arginine-rich, Lysine-rich Histone in a Highly Purified Form
J. Biol. Chem. 243, 2038 - 2047, (1968)

45 Hempel K., Lange H.W., Birkofer L.:
N^{ε}-Methylierte Lysine in Histonen aus Hühner-Erythrozyten
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 603 - 607. (1968)

46 Matsuoka Y., Kumon A., Nakajima T., Kakimoto Y., Sano I.:
Identification of ε-N-methyl-L-lysine and δ-N-methylornithine in bovine brain.
Biochim. Biophys. Acta 192, 136 - 137, (1969)

47 Delange R.J., Fambrough D.M., Smith E.L., Bonner J.:
Calf and Pea Histone IV
J. Biol. Chem. 244, 319 - 334, (1969)

48 Hardy M.F., Harris C.I., Perry S.V., Stone D.:
Occurrence and Formation of the N -Methyl-lysines in Myosin and Myofibrillar Proteins
Biochem. J. 120, 653 - 660, (1970)

49 Berridge B.J., Chao W.R., Peters J.H.:
Column Chromatographic Analysis of Tryptophan with the Basic Amino Acids
Anal. Biochem. 41, 256 - 264, (1971)

50 Reporter M., Corbin J.L.:
N^G,N^G-Dimethylarginine in Myosin During Muscle Development
Biochem. Biophys. Res. Comm. 43, 644 - 650, (1971)

51 Murray, K.:
The Occurrence of ε-N-Methyl Lysine in Histones
Biochem. 3, 10 - 15, (1964)

52 Kraffczyk F., Helger R., Lang H., Bremer H.J.:
Amino Acid Anomalies in Urine without Desalting using Internal Standards
Clin.Chim. Acta 35, 345 - 351, (1971)

53 Lou M.F., Hamilton P.B.:
Hydroxylysine Glycosides in Human Urine
Clin. Chem. 17, 782 - 788, (1971)

54 Hamilton P.B., Lou M.F.:
Column Chromatographic Separations of Amino Acids, Peptides, and Protein in Normal Human Urine
Biochem. Med. 6, 193 - 204, (1972)

55 Mönch E., Rohnelt M., Siemens H., Lison H., Friedrich R., Fuhr H.:
Beeinflussung der Screening-Tests auf angeborene Stoffwechselstörungen durch Medikamente
Mschr. Kinderheilk. 121, 483 - 484, (1973)

56 Bremer H.J., Duran M., Kamerling J.P., Przyrembel H., Wadman S.K.:
Disturbances of Amino Acid Metabolism: Clinical Chemistry and Diagnosis
Urban & Schwarzenberg, Baltimore (USA) - München (1981)

57 Neuberger A.:
Metabolism of Proteins and Amino Acids
Ann. Rev. Biochem. 18, 243, (1949)

58 Carver M.J., Paska R.:
Ion-Exchange Chromatography of Urinary Amino Acids
Clin. Chim. Acta 6, 721 - 724, (1961)

59 Dickinson J.C., Hamilton P.B.:
The Free Amino Acids of Human Spinal Fluid Determinated by Ion Exchange Chromatography
J. Neurobiochem. 13, 1179 - 1187, (1966)

60 Moore S., Stein W.H.:
A Modified Ninhydrin Reagent for the Photometric Determination of Amino Acids and Related Compounds
J. Biol. Chem. 211, 907 - 913, (1954)

61 Moore S., Stein W.H.:
Photometric Ninhydrin Method for Use in the Chromatography of Amino Acids.
J. Biol. Chem. 176, 367 - 388, (1948)

62 Rosen H., Berard C.W., Levenson St.W.:
A simplified Procedure for Automatic Amino Acid Analysis
Anal. Biochem. 4, 213 - 221, (1962)

63 Markiw R.T.:
Isolation of N-Methylated Basic Amino Acids from Physiological Fluids and Protein Hydrolysates
Biochem. Med. 13, 23 - 27, (1975)

64 Hill, R.L.:
Hydrolyse of Proteins
Adv. Prot. Chem. 20, 37 - 107, (1965)

65 Scriver C.R., Clow C.L., Lamm P.:
On the Screeing Diagnosis and Investigation of Hereditary Aminoacidopathies
Clin. Biochem. 6, 142 - 188, (1973)

66 Khachadurian A., Knox W.E., Cullen A.M.:
Colorimetric Ninhydrin Method for total Alpha Amino Acids of Urine
J. Lab. Clin. Med. 56, 321 - 332, (1960)

67 Harris C.K., Tigane E., Hannes G.S.
Quantitative Chromatographic Methods
Part 7: Isolation of Amino Acids from Serum and other Fluids
Canad. J. Biochem. 39, 439 - 451, (1961)

68 Przyrembel H., Leupold D., Tosberg P., Bremer H.J.:
Amino Acid Excretion of Premature Infants Receiving Different Amounts of Protein
Clin. Chim. Acta. 49, 27 - 39, (1973)

69 Long C.L., Geiger J.W.:
A Rapid Ion Exchange Method for Quantitation of the Urinary Excretion of 3-Methylhistidine
Biochem. Med. 12, 267 - 273, (1975)

70 Berridge B.J., Chao W.R., Peters J.H.:
Analysis of plasma and Urinary Amino Acids by Ion-Exchange Column Chromatography
American J. Clin. Nutrition 24, 934 - 939, (1971)

71 Orten A.U., Doppke H.J., Spurrier H.H.:
Increased Sensitivity in Automatic Amino Acid Analysis Obtained with a Special Hybrid Recorder
Anal. Chem. 37, 623 - 624, (1965)

72 Curtis H.-Ch., Martenet A.C., Anders P.W.:
Bestimmung von freien Aminosäuren im Augenkammerwasser des Menschen bei Homocystinurie - Patienten und Kontrollfällen
Clin. Chim. Acta 19, 469 - 476, (1968)

73 Kirsten E., Kirsten R.:
A Nanomole Adaption of the Automatic Amino Acid Analysis According to Spackman, Stein, and Moore (1958)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 7, 76 - 81, (1962)

74 Oepen H., Oepen I.:
Vergleich der Aminosäurespektren unterschiedlich enteiweißter Blutseren
Klin. Wschr. 41, 921 - 926, (1963)

Danksagung

Herrn Prof.Dr.H.-J.Bremer danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für die ständigen Anregungen während der experimentellen Durchführung.
Weiterhin bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Stoffwechsellabors, die mir in schwierigen Situationen schnelle Hilfe gewährten.

Lebenslauf

Am 5.November 1953 wurde ich, Lothar Wiesner, als Sohn des Paul Wiesner und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Geppert, in Düsseldorf geboren. Nach einer 4jährigen Volksschulzeit besuchte ich das Rethel-Gymnasium in Düsseldorf, an dem ich 1972 das Abitur bestand.
Von 1972 bis 1974 studierte ich Chemie an den Universitäten Bonn und Düsseldorf. Im Wintersemester 1974 begann ich mit dem Lehramtsstudium für die Sekundarstufe I (Biologie/ Chemie) an der Pädagogischen Hochschule Rheinland/ Abt. Neuss, die ich 1979 mit dem Abschluß des 1. Staatsexamens verließ.
Das Medizinstudium absolvierte ich an der Universität Essen und später an der Universität Düsseldorf, wo ich am 22.10.1982 das Medizinische Staatsexamen bestand.
Von Januar bis März 1983 war ich als Assistenzarzt für Anästhesie am Krankenhaus Maria Hilf in Mönchengladbach beschäftigt. Danach wechselte ich in die chirurgische Abteilung des Liebfrauen-Krankenhauses in Düsseldorf.

FOTODRUCK J. MAINZ GmbH
Neupforte 13, Nähe Markt, D-5100 Aachen
Telefon: (0241) 27305 und (0241) 38606